



CONFÉDÉRATION SUISSE

BUREAU FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

Classification :

53 e, 5
53 k, 5/01

Int. Cl. :

A 23 c 5/00
A 23 l 1/30

Numéro de la demande :

5161/65

Date de dépôt :

13 avril 1965, 17 ³/₄ h.

Priorités :

France, 16 avril et 16 juillet 1964
(971 190, 981 920, 981 919)

Brevet délivré le

31 juillet 1967

Exposé d'invention publié le 15 janvier 1968

BREVET PRINCIPAL

Centre National de la Recherche Scientifique, Paris (France)

Procédé de préparation d'un produit riche en vitamines du groupe B

Rosalie Karlin née Weissmann, Lyon (France), est mentionnée comme étant l'inventeur

1

La présente invention concerne un procédé de préparation d'un produit riche en vitamines du groupe B, et spécialement en vitamine B₁₂.

Ce procédé est caractérisé en ce que l'on cultive du *Propionibacterium shermanii* et au moins un autre micro-organisme choisi parmi les levures lactiques et l'*Empedobacter munsterii* dans un sous-produit de l'industrie laitière, les micro-organismes étant cultivés en symbiose ou au moins l'un des micro-organismes étant cultivé dans un milieu séparé, auquel cas on réunit subséquentement les milieux de culture.

Dans les comptes-rendus de l'Académie des Sciences (tome 256 p. 1164-1165, C. R. Soc. Biol. 1963, 67, 850-853 et J. Inter. Vitamin. 1963, 33, 311-320) on a décrit l'isolement de l'*Empedobacter munsterii*, en signalant son pouvoir vitaminogène.

Selon une première forme de réalisation du présent procédé, onensemence très abondamment du lactosérum avec le germe *Empedobacter*, éventuellement additionné de 0,05 à 0,1 g % (en poids frais) de levures lactiques, on maintient pendant 2 à 4 jours sous agita-

2

tion à une température constante comprise entre 28° C et 30° C, on ajoute au mélange ensemencé et agité du germe *Propionibacterium shermanii*, on laisse reposer pendant 2 à 3 jours sans agitation en conservant la même température constante et on recueille le produit obtenu.

Le procédé peut être mis en œuvre par lots ou en continu.

Selon une autre mise en œuvre avantageuse du procédé, on prépare séparément trois volumes égaux de culture de chacun des *Empedobacter munsterii*, levure N° 8, *Propionibacterium shermanii*, on transvase séparément chacune de ces cultures dans un volume, 10 à 15 fois plus grand, de lacto-sérum réduit au quart, on laisse incuber pendant 18 à 24 heures, on mélange les trois cultures et on transforme en poudre dans un atomiseur. (Tour de séchage de Nuro par exemple.)

En opérant sur des cuves de 15 litres de cultures et de 100 litres de lacto-sérum réduit au quart, la poudre obtenue répondait aux caractéristiques ci-après :

Composition de la poudre

Vitamines en mg dans 1000 g de poudre

Poids sec	98 %
Humidité	2 %
Protéines totales	13 à 14 %
Lactose anhydre	73 à 74 %
Lactose hydraté	76 à 78 %
Sels (cendres à 550°).....	4 % (environ)
pH reconstitué à 10 %	6,3-6,4
Acidité	17 à 18° Dornic

B 1	10 à 20 mg
B 2	50 à 90 mg
B 6	10 à 20 mg
Acide nicotinique	20 à 30 mg
Acide pantothénique.....	100 à 200 mg
Acide folique	0,4 à 0,6 mg
Acide folinique	0,1 à 0,8 mg
Biotine	0,5 à 0,7 mg
B 12	0,5 à 10 mg

Cette poudre, d'un goût agréable, légèrement sucré, est presque totalement soluble et ne se prend pas en masse.

On peut opérer comme suit :

1°) Le lacto-sérum est avantageusement du sérum de Gruyère additionné de 0,25 à 1 g %, de préférence 0,5 g %, de nitrate d'ammonium, de 0,0002 à 0,004 g %, de préférence 0,003 g %, de chlorure de cobalt et 0,001 g % de sulfate de manganèse, le mélange étant ajusté à un pH de 7,15 à 7,2, précipité par chauffage à 110° C pendant 15 minutes environ, filtré et pasteurisé à 70° pendant 10 minutes (ou stérilisé pendant 15 minutes à 119-120° C).

L'*Empedobacter* utilisé est préparé à la manière connue par culture sur grandes boîtes de Pétri (diamètre : 150 mm) contenant une gélose nutritive. La quantité d'*Empedobacter* mise en œuvre pour l'ensemencement est, en poids frais, de 0,05 à 0,1 g % du lacto-sérum.

Le *Propionibacterium shermanii* est préparé par culture sur le milieu de Neronova et coll. (*Microbiologia*, 1959, 28, 647, U.R.S.S.); on en ajoute de 0,1 à 0,15 g % du mélange lacto-sérum *Empedobacter*.

Au lacto-sérum on peut ajouter de 0,05 à 0,1 g % de levures lactiques vivantes telles que le « *Saccharomyces fragilis* », « *Saccharomyces steineri* », « *Saccharomyces marxianus* » et « *Torulopsis* sp. Ly. 369 ».

Les levures sont préparées par des cultures à 30° pendant 24 heures de « *Saccharomyces fragilis* », « *Saccharomyces steineri* », « *Saccharomyces marxianus* » ou « *Torulopsis* sp. Ly. 369 » sur boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive (diamètre 150 mm).

2°) Suivant une autre exécution du procédé selon l'invention, onensemence l'*Empedobacter*, *P. shermanii* et une levure lactique en symbiose sur un milieu minéral additionné de glucose. Les trois mêmes micro-organismes sont cultivés pendant 5 à 7 jours, entre 28 et 30° sur ce milieu et on recueille la biomasse résultant de cette culture.

La composition dudit milieu est de préférence la suivante :

Sulfate ou nitrate d'ammonium.....	1	%
Phosphate de potassium bi-potassique.....	0,8	%
Phosphate de potassium mono-potassique.....	0,6	%
Sulfate de magnésium.....	0,02	%
Chlorure de cobalt.....	0,003	%

Ce milieu est stérilisé par un chauffage de 15 minutes à 120° C.

On y ajoute aseptiquement avant l'emploi 2 g % de glucose (5 ml % d'une solution stérile de glucose à 40 %). La culture en association est réalisée comme suit : sur ledit milieu minéral on cultive pendant 5 à 7 jours l'*Empedobacter munsterii* à raison de 0,05 % à 0,1 % du milieu minéral; le *P. shermanii* à raison de 0,1 à 0,15 % de la culture d'*Empedobacter* et une levure (*Saccharomyces*) à raison de 0,05 à 0,1 % de la culture en symbiose.

On opère ensuite comme il a été indiqué plus haut pour le lacto-sérum.

3°) Comme indiqué aux paragraphes 1 et 2, on prépare séparément 15 litres de culture respectivement d'*Empedobacter munsterii*, de levure N° 8 et de *Propionibacterium shermanii*.

On transfère séparément ces cultures dans des cuves contenant chacune 100 litres de lacto-sérum préalable-

ment réduit au quart. Après une incubation de 18 à 24 heures, on mélange les contenus des trois cuves et on les transforme en poudre dans un appareil atomiseur d'une vitesse de rotation appropriée.

La poudre est ensuite incorporée, s'il y a lieu, dans des quantités appropriées d'aliments.

Pour la mise en œuvre du présent procédé (exemples 1°) et 2°) en continu, on peut utiliser un appareil de type connu, par exemple l'appareil de J. Monod (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1950, 79, 390-410) ou celui de Neronova N.M. et Jerousalimski N.D. (*Microbiologia U.R.S.S.*, 1959, 28, 647-657), qui est à toutes fins utiles décrit ci-après.

A la partie supérieure d'un bâti 1 est monté, de manière réglable en hauteur, un récipient 2 destiné à contenir le milieu nutritif 3; le récipient 2 est muni de deux branchements 4 et 5 reliés à un tube plongeur 6 et d'un tube 7 pour l'évacuation du gaz (air en général) contenu dans le récipient 2, lors de son remplissage. Des fermetures 4', 5' et 7', automatiques ou non, sont prévues sur chaque tube 4, 5, 7. Le branchement 5 s'ouvre à l'entrée d'air quand on ferme la fermeture 7'. A sa partie inférieure le récipient 2 est muni d'une évacuation 8 pour le milieu nutritif reliée par une tubulure 9 avec fermeture 9' à un dispositif goutte à goutte 10 porté par le bâti 1. Le goutte à goutte 10 est équipé d'une tubulure 11 d'évacuation des gaz de fermentation et d'une tuyauterie 12, dont les orifices sur le goutte à goutte sont à un niveau supérieur à celui de l'extrémité inférieure libre de la tubulure 9.

Au-dessous du goutte à goutte 10, le bâti 1 porte un premier cultivateur 13 de forme générale cylindrique et traversé axialement par un tube capillaire plongeur 14 formant par son extrémité supérieure un prolongement du goutte à goutte 10. Le cultivateur 13 est relié d'une part au goutte à goutte 10 par une tuyauterie 15 permettant de faire passer les gaz de fermentation du cultivateur 13 dans le goutte à goutte 10 débouchant dans ce goutte à goutte en 12 plus haut que l'extrémité inférieure de la tubulure 9 et, d'autre part, à un récipient 17 de recueil du liquide de culture par un tube 18 avec fermeture 18' permettant des prises d'échantillon. Enfin, le cultivateur 13 est muni d'une tuyauterie 19 permettant le reflux d'un excès de liquide de culture dans un second goutte à goutte 20, monté sur le bâti 1 à un niveau inférieur. Le goutte à goutte 20 est équipé, comme le goutte à goutte 10, d'une tubulure 22 d'évacuation des gaz de fermentation, d'une tuyauterie 23 et d'un capillaire axial 22.

Le bâti 1 porte, enfin, au-dessous du goutte à goutte 20, un second cultivateur 25 à trois volumes différents (dans l'exemple représenté), traversé axialement par le prolongement plongeur 24 du capillaire réuni au goutte à goutte 20 par la tuyauterie 23 et muni de trois évacuations de liquide de culture 26, 27, 28, qui correspondent chacune avec un récipient de recueil 29 et permettent la prise d'échantillons aux niveaux supérieur, intermédiaire et inférieur de chaque volume du cultivateur 25. Les évacuations 26, 27, 28 comportent chacune une fermeture 26', 27' et 28'. Enfin une tuyauterie 30 avec fermeture 30' relie la partie supérieure du cultivateur 25 à un récipient 16 contenant par exemple du carbonate de sodium.

Les divers éléments de l'appareil peuvent être mis séparément en température et/ou agités, par tous moyens appropriés connus. Les diverses fermetures 4', 5', 7', 9', 18', 26', 27', 28', 30' sont du type à vis hélicoïdale.

Dans le récipient 2 où le milieu nutritif arrive par la tubulure 4 on maintient une pression hydrostatique constante à l'aide de la tubulure 5-6 le reliant à l'atmosphère. La vis qui est sur la tubulure 7 est alors fermée.

La vitesse d'écoulement du milieu dépend de la différence de niveau du liquide entre l'extrémité inférieure du tube 6 et l'extrémité du tube 9 d'où le milieu s'écoule goutte à goutte. Pour réaliser la vitesse désirée on établit un niveau convenable d'écoulement du compte-goutte à l'aide d'un dispositif spécial 31 monté sur la tablette 1, puis on le règle définitivement au moyen d'une vis hélicoïdale 9'. Pour contrôler cette vitesse on mesure le volume du liquide fermenté qui s'écoule de la tubulure 18.

On peut utiliser soit uniquement le premier cultivateur 13 ou, lorsqu'on veut augmenter le rendement, on peut utiliser en même temps le deuxième cultivateur 25 en faisant passer le liquide nutritif à travers la tubulure 19 et le compte-goutte 20 dans le cultivateur 25. Ce cultivateur possède trois tubulures de dérivation 26, 27 et 28 à des niveaux différents. Selon que l'on met en circuit l'une ou l'autre de ces tubulures la capacité utile du cultivateur est plus ou moins élevée.

On a constaté qu'en opérant selon l'invention, l'enrichissement en vitamines, en particulier du groupe B et spécialement en vitamine B₁₂, était beaucoup plus élevé qu'en cultivant uniquement l'*Empedobacter*. Ceci ressort des tableaux suivants dans lesquels les teneurs en vitamines sont exprimées en µg par litre. Pour des exemples 1 et 2, le tableau I donne les résultats obtenus avec l'*Empedobacter* seul, les tableaux II, III et IV concernant les résultats fournis par des procédures selon l'invention. Les tableaux comparatifs V et VI donnent les résultats correspondants obtenus respectivement selon l'exemple 3°) ci-dessus et selon une méthode usuelle.

I. — Enrichissement avec *Empedobacter* seul

Vitamines en µg par litre	Témoin avant	Après	
		4 jours	7 jours
B ₁	—	334	315,0
B ₂	1.340	1.675	2.200,0
B ₆	325	780	872,0
PP	550	1.064	1.218,0
Acide folique	11,9	49,0	55,0
Acide folinique	3,0	25,0	37,5
Biotine	39,7	24,6	20,0
B ₁₂ avec précurseur	1,50	36,4	115,0

II — Enrichissement du lacio-sérum avec *Empedobacter* et *P. shermannii*

Vitamines en µg par litre	Témoin avant	Après	
		3 jours	5 jours
B ₁	370	414	1.418
B ₂	1.340	1.500	1.625
B ₆	325	770	830
PP	550	1.500	6.550
Acide pantothénique	3.100	2.420	2.490
Acide folique	11,9	31	125
Acide folinique	3,0	20	3
Biotine	39,7	22,2	37,5
B ₁₂	1,5	7,25	510

NOTA — Dans le cas II, l'enrichissement se poursuit jusqu'à atteindre son maximum après 5 jours.

III — Enrichissement du lacto-sérum réduit au $\frac{1}{4}$ par l'*Empedobacter*,
le *Saccharomyces* N° 8 et *P. shermannii*

Vitamines en μg par litre	Témoin avant	Après	
		16 heures	24 heures
B ₁	1330	1358	1380
B ₂	4970	5310	5775
PP	1150	1700	2300
Acide pantothénique	12900	13050	13550
Acide folique	4,9	56,5	45,0
Acide folinique	2,1	16,6	19,5
Biotine	26,7	38,2	50,2
B ₁₂	6,7	126,0	144,0

IV — Enrichissement du lacto-sérum réduit au $\frac{1}{4}$
par l'*Empedobacter munsterii* et *P. shermannii* (sans levure)

Vitamines en μg par litre	Témoin avant	Après	
		16 heures	24 heures
B ₁	1330	1220	1300
B ₂	4970	4560	6000
PP	1150	2000	2000
Acide pantothénique	12900	12280	12380
Acide folique	4,9	30,0	35
Acide folinique	2,1	13,6	10,7
Biotine	26,7	37,0	40,0
B ₁₂	6,7	145	150,0

Les produits recueillis à la fin du procédé selon l'invention et séchés peuvent être utilisés tels quels ou en combinaison avec tous aliments pour les animaux. On utilise de préférence une quantité desdits produits allant de 3 à 5 % en poids par rapport à l'aliment considéré.

La poudre obtenue est enrichie en vitamines B, notamment en vitamine B₁₂, d'un goût agréable légèrement sucré, presque totalement soluble dans l'eau, et de couleur blanc légèrement jaunâtre.

Cette poudre, qui ne se prend pas en masse, est définie par les caractéristiques suivantes :

- a) protéines totales de 13 à 14 %
lactose anhydre de 73 à 74 %
lactose hydraté de 76 à 78 %
sels (d'après les cendres à 550°) : 4 % environ
pH reconstitué à 10 % : 6,3 à 6,4
acidité 17 à 18 degrés Dornic
humidité 2 %
poids sec 98 %

b) teneur en vitamines (en milligrammes par 1000 g de poudre) :

B ₁	10 à 20
B ₂	50 à 90
B ₆	10 à 20
acide nicotinique	20 à 30
acide pantothénique	100 à 200
acide folique	0,4 à 0,6
acide folinique	0,1 à 0,3
biotine	0,5 à 0,7
B ₁₂	6,5 à 10

Ladite poudre peut être l'élément actif d'aliments diététiques à raison de 3 à 7 % en poids, de préférence 5 % de l'aliment désiré.

On constate que l'enrichissement effectué avec du lacto-sérum réduit au $\frac{1}{4}$, sans levure, a un effet plus prononcé sur la teneur finale de la poudre en vitamine B₁₂.

On peut donc profiter de cette circonstance pour préparer des aliments diététiques à prédominance de vitamine B₁₂.

V — Biosynthèse de vitamines du groupe B par trois micro-organismes
cultivés en symbiose sur un milieu minéral additionné de glucose

Vitamines en µg par litre	Symbiose I		Symbiose II		Symbiose III		Symbiose IV		Symbiose V	
	4 jours	7 jours	4 jours	7 jours	4 jours	7 jours	4 jours	7 jours	4 jours	7 jours
B ₁	200	218	170	180	160	205	250	230	227	295
B ₂	450	530	485	425	375	388	450	425	425	465
B ₆	80	100	945	965	1100	1110	1010	1090	285	295
PP	2790	3120	1500	1800	1960	2100	1050	1060	2400	2400
Acide pantothénique	950	1250	550	700	—	—	—	—	—	—
Acide folique	123	130	71	69	75	75	73	75	103	130
Biotine	21	22	10	10	10	10	9	9	14	14
B ₁₂ (sans précurseur)	110	90	105	120	90	100	105	105	80	90

Symbioses : I = Empedobacter munsterii + P. shermannii + Saccharomyces steineri
 II = Empedobacter munsterii + P. shermannii + Saccharomyces fragilis (2)
 III = Empedobacter munsterii + P. shermannii + Saccharomyces fragilis (8)
 IV = Empedobacter munsterii + P. shermannii + Saccharomyces marxianus
 V = Empedobacter munsterii + P. shermannii + Torulopsis sp. Ly. 369

VI — Enrichissement en vitamines du groupe B du lacto-sérum de gruyère
par une symbiose de trois micro-organismes

Vitamines en gamma par litre	Témoin avant	Symbiose I		Symbiose II	
		4 jours	7 jours	4 jours	7 jours
B ₁	354	370	364	391	384
B ₂	1250	1400	1638	1450	1450
B ₆	185	166	175	950	980
PP	384	2700	2840	3180	2750
Acide pantothénique	—	3000	2900	2500	2550
Acide folique	17	170	182	181	238
Biotine	14	28	24	25	29
B ₁₂	0,4	115	90	129	100

Symbioses : I — *Empedobacter munsterii* + *P. shermannii* + *Saccharomyces steineri*

II — *Empedobacter munsterii* + *P. shermannii* + *Saccharomyces fragilis*

REVENDEICATION

Procédé de préparation d'un produit riche en vitamines B, caractérisé en ce que l'on cultive du *Propionibacterium shermannii* et au moins un autre micro-organisme choisi parmi les levures lactiques et l'*Empedobacter munsterii* dans un sous-produit de l'industrie laitière, les micro-organismes étant cultivés en symbiose ou au moins l'un des micro-organismes étant cultivé dans un milieu séparé, auquel cas on réunit subséquemment les milieux de culture.

SOUS-REVENDEICATIONS

1. Procédé selon la revendication, caractérisé en ce que le milieu de culture consiste en lacto-sérum.

2. Procédé selon la sous-revendication 1, caractérisé en ce que l'on effectue la culture pendant deux à quatre jours à température constante comprise entre 28 et 30° C.

3. Procédé selon la revendication, caractérisé en ce que l'onensemence très abondamment du lacto-sérum avec l'*Empedobacter munsterii*, on maintient le milieuensemencé pendant 2 à 4 jours sous agitation à une température constante comprise entre 28 et 30° C, puis on ajoute au milieuensemencé et agité du *Propionibacterium shermannii* et on laisse reposer le milieu pendant 2 à 3 jours sans agitation en conservant la même température constante.

4. Procédé selon la sous-revendication 3, caractérisé en ce que l'onensemence également le lacto-sérum avec 0,05 à 0,1 % en poids de levures lactiques.

5. Procédé selon la revendication ou la sous-revendication 1, caractérisé en ce que l'on cultive l'*Empedobacter munsterii* et une levure lactique en symbiose et

on cultive le *Propionibacterium shermannii* en milieu séparé.

6. Procédé selon la revendication ou la sous-revendication 1, caractérisé en ce que l'on cultive le *Propionibacterium shermannii*, une levure lactique et l'*Empedobacter munsterii* dans trois milieux séparés.

7. Procédé selon la revendication ou l'une des sous-revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on utilise comme milieu de culture du lacto-sérum de gruyère additionné de 0,25 à 1 % de nitrate d'ammonium, de 0,0002 à 0,004 % de chlorure de cobalt et de 0,001 % de sulfate de manganèse, en poids, le mélange étant ajusté à un pH de 7,15 à 7,2, précipité par chauffage à 110° C environ, filtré et pasteurisé ou stérilisé.

8. Procédé selon la sous-revendication 7, caractérisé en ce que l'on utilise 0,5 % de nitrate d'ammonium et 0,003 % de chlorure de cobalt.

9. Procédé selon la revendication, caractérisé en ce que l'on utilise le *Propionibacterium shermannii* à raison de 0,1 à 0,15 % en poids du milieu de culture.

10. Procédé selon la sous-revendication 1, caractérisé en ce que l'onensemence le lacto-sérum avec une culture de 5 à 7 jours, sur milieu minéral additionné de 2 % de glucose, de l'*Empedobacter munsterii* à raison de 0,05 % à 0,1 % du milieu minéral, de *Propionibacterium shermannii* à raison de 0,1 à 0,15 % de la culture d'*Empedobacter* et de *Saccharomyces* à raison de 0,05 à 0,1 % de la culture en symbiose.

11. Procédé selon la sous-revendication 1, caractérisé en ce que l'on utilise l'*Empedobacter* à raison de 0,05 à 0,1 % en poids du lacto-sérum.

Centre National de la Recherche Scientifique
Mandataires: Dériaz, Kirker & C^{ie}, Genève



This Page Blank (usps)